AquaDocs

La culture primaire de la rétine du Psammomys obesus: un procédé d'évaluation de la capacité antioxydante de biomolécules d'origines marines, Actes du Vème meeting: Innovation dans le secteur Halio-Alimentaire et Bioproduits: Développement de nouvelles procédures II, Gammarth 27-29 juillet 2015.

Item Type	Journal Contribution
Authors	Baccouche, Basma; Mbarek, Sihém; Dellaa, Ahmed; Hammoum, Imene; Ben Chaouacha, Rafika
Download date	06/01/2023 08:26:27
Link to Item	http://hdl.handle.net/1834/9053

La culture primaire de la rétine du *Psammomys obesus*, un procédé d'évaluation de la capacité antioxydante de biomolécules d'origines marines

Basma Baccouche [a], Sihém Mbarek [a], Ahmed Dellaa [a], Imane Hammoum [a] et Rafika Ben Chaouacha-chekir [a]

a. Unité de recherche Ecophysiologie et Procédés Agroalimentaires (EPA) UR11ES44,Institut Supérieur de Biotechnologie Sidi Thabet, Université de la Manouba, BiotechPole Sidi Thabet 2020, Sidi Thabet, Tunisie

Emails des auteurs : Rafika Ben Chaouacha-chekir: raf_chekir@yahoo.fr; Basma Baccouche: basmabac@gmail.com; Sihém Mbarek : sihemmbarek@gmail.com ; Ahmed Dellaa : ahmad.dellaa@gmail.com; Imane Hammoum : hammoum.imane@gmail.com

RESUME

La Rétinopathie diabétique (RD) est une complication grave conduisant à la perte progressive de la fonction visuelle et à la cécité. Il a été suggéré que la rétine neuronale est altérée pendant les premiers stades du diabète. Le rongeur *Psammomys obesus* (*P.ob*), un modèle expérimental de diabète type-2, développe des altérations cellulaires de la rétine caractéristiques de la RD. Nous avons établi *in vitro* un modèle de cellules rétiniennes de *P.ob* en conditions hyperglycémique afin de tester l'effet de biomolécules antioxydantes d'origines marines telles que la fucoxanthine et l'astaxanthine.

Les cellules rétiniennes de *P.ob* ont été incubées à une concentration normale de glucose (5 mM), ainsi que des conditions d'hyperglycémie 25 et 40 mM pendant 5 jours. Le métabolisme ainsi que la viabilité des cellules ont été évalués par le test MTT, bleu de trypan, et DAPI.

Les valeurs MTT ont diminué de façon significative avec les concentrations croissantes de glucose (25 mM ($p < 0,01$); 40 mM ($p < 0,01$). La survie cellulaire a été significativement inhibées par 25 mM de glucose ($p < 0,05$) et 40mm ($p < 0,05$) par rapport aux cellules témoins cultivées dans 5 mM de glucose.

Ces résultats suggèrent que les cellules rétiniennes de *P.ob* peuvent représenter un système fiable de culture cellulaire pouvant être exploité dans la compréhension et le traitement de la maladie.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is the most common retinal disease leading to the progressive loss of visual function and blindness. It have been suggested that the neuronal retina is altered during the early stages of diabetes. The sand rat *Psammomys obesus* (*P.ob*), a spontaneous model of type-2 diabetes, exhibit retinal degeneration under hyperglycemic conditions. We investigated *in vitro* the alterations of *P.ob* retinal cells under hyperglycemic condition as a tool to study the protective effect of antioxidant marine molecules.

P.ob retinal cells were incubated at a normal concentration of glucose (5 mM) as well as hyperglycemic conditions 25 and 40 mM for 5 days. Mitochondrial metabolism and cell viability were assessed by the MTT test, trypan blue assay, and DAPI staining.

MTT values decreased significantly with the increasing concentration of glucose (25 mM ($p<0.01$); 40mM ($p<0.01$). Trypan blue exclusion dye revealed that incubation in the presence of 25 and 40mM of glucose, less than 50% of the retinal cells survived compared to control and that the percentages of positive DAPI were significantly inhibited by high glucose 25mM ($p<0.05$) and 40mM ($p<0.05$) compared to that in cells cultured in 5mM of glucose.

These results suggest *P.ob* retinal neurons may represent a novel cell culture model system that can be used gain understanding and treatment of the disease

INTRODUCTION

La rétinopathie diabétique (RD) est une complication du diabète, résultant de l'atteinte des vaisseaux de la rétine. Des études expérimentales et cliniques ont suggéré que les changements vasculaires sont accompagnés par la neurodégénérescence et de la perte de la fonction visuelle , qui apparaissent peu après l'apparition du diabète (Antonetti *et al.,* 2006). Certaines recherches ont suggéré que, dans la rétine diabétique, les cellules neurales pourraient initier la lésion vasculaire caractéristique de RD (Du *et al.,* 2013). Pour mieux comprendre la cause de la dégénérescence rétinienne, de nombreuses recherches ont utilisé des modèles animaux pour étudier tous les aspects de la RD au niveau vasculaire et neuronale (Robinson *et al.,* 2012). Le *Psammomys obesus* (*P ob*), un rongeur semi-désertique diurne, est largement exploité dans les études du diabéte (Shafrir *et al.,* 2006; Ziv *et al.,* 2009) et de la RD (Saidi (Saidi *et al.,* 2011). On s'est intéressé dans cette étude à mettre en évidence l'effet cytotoxique, induit par de fortes concentrations en glucose, sur les cellules rétiniennes primaires de *P ob*.

MATERIELS ET METHODES

Animaux

Psammomys obesus est capturé dans la région de Gafsa puis tranféré à l'animalerie et mis en acclimatation pour une période de 15 jours dans des conditions standards de température 25°C ± 5°C et d'humidité relative 70% ± 5%. L'exploration de la physiopathologie rétinienne chez le *P ob* suit les règles d'éthiques décrites par l'association pour la recherche en vision et en ophtalmologie (ARVO) pour l'utilisation des animaux en recherches sur la vision « Statement on Use of Animals for Research in Vision and Ophthalmology ».

Mise en culture primaire de la rétine de *P ob.*

Immédiatement après le sacrifice des *P ob*. adultes, les yeux sont énuclés , rincés à l'alcool et placés dans du PBS (Phosphate-buffered saline) 1X. Les globes oculaires sont disséqués sous loupe binoculaire. La lentille et la cornée sont écartées. La rétine neurale est délicatement séparée de l'épitheluim pigmentaire rétinien (EPR), transférée dans du DMEM Low glucose (Biowest) puis sectionnée. Le tissue rétinien est transféré dans un tube stérile contenant une solution de digestion (0.05%). Un volume égal de DMEM est ajouté pour stopper la réaction. Après une dispersion mécanique, les cellules sont centrifugés à 1000g pendant 5mn puis resuspendu dans du milieu de culture. Après élimination du surnagent, la suspension cellulaire est transférée dans un tube Falcon contenant du DMEM supplémenté avec 10% d'albumine de sérum de bœuf et 0.1% de L-glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 50 U/ml pénicilline, et 50 µg/ml streptomycine (Pen Strep, Gibco). Les cellules sont incubées dans des plaques de 12 prétraitées avec de la poly-L-lysine à une densité de $1x10^6$/ml à 37°C, humidité à 95% et CO_2 à 5%.

Traitement des cellules rétiniennes de *P ob*

Afin de mimer les stades de la RD, 20 et 35mM de D-glucose sont ajoutés au milieu de culture DMEM low glucose après 24h de l'ensemencement des cellules (pour atteindre 25 et 40mM de glucose) pendant 5 jours. Les cellulaires rétiniennes cultivées dans 5mM de glucose servent de culture témoin.

Test MTT

Le MTT (bromure de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium) est un substrat chromogène réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Chaque puits est supplémenté par 20µl d' MTT à 5 mg/mL. Après une incubation pendant 4h, le surnageant est éliminé puis remplacé par 180 µL de DMSO pour solubiliser les cristaux de formazan. La mesure de l'absorbance est réalisée à 570 nm. Le taux de conversion a été calculé comme suit : (MTT réduction)% = (DO de l'échantillon traité / DO de l'échantillon non traité) × 100.

Test d'exclusion par bleu de trypan

Le test de viabilité cellulaire a été évalué par le colorant bleu trypan (BT). La solution de BT 0,4% (Gibco) a été mélangée avec la suspension cellulaire puis chargée dans une cellule de Malassez. les cellules sont quantifiées avec un microscope inversé Leica . Le pourcentage de viabilité a été calculé comme suit : cellules viables (%) = (cellules non colorées) / (nombre total de cellules) x 100).

Immunohistochimie :

Après 120h d'exposition à 25 et 40 mM de glucose, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées avec du PBS (1X) puis fixées par une solution de paraformaldehyde (PFA) à 4% pendant 15 min à TA. Les cellules ont été perméabilisées dans 0,1% de Triton X-100 (Sigma) dans du PBS pendant 5 min puis incubées dans une solution de blocage (0,1% de Triton X-100, 3% d'albumine de sérum bovin, 0,1% de Tween 20 dans du PBS) pendant 30 min. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec DAPI 4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (1 ug / ml; Invitrogen) dans du PBS. Les lames sont visualisées en utilisant un objectif 10X du microscope à fluorescence Leica DM400B. Les cellules positives ont été comptées manuellement.

Analyse statistique

Les données sont exprimées par la moyenne ± écart-type. L'analyse statistique a été de réalisée en utilisant le test t de Student avec les valeurs $P < 0,01$ et $P < 0,05$ considérées comme significatives.

RESULTATS

Effet des concentrations cytotoxiques de glucose sur l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules rétiniennes de *P ob*

L'exposition des cellules rétiniennes à des concentrations élevées de glucose a provoqué une diminution significative de l'activité des déshydrogénases mitochondriales (25 mM ($P < 0,01$) ; 40 mM ($P < 0,01$)). Sous 25 mM et 40 mM de glucose, les valeurs de MTT ont chuté à 41.181 ± 2.43%. 17,58 ± 2,19 respectivement (Fig. 1).

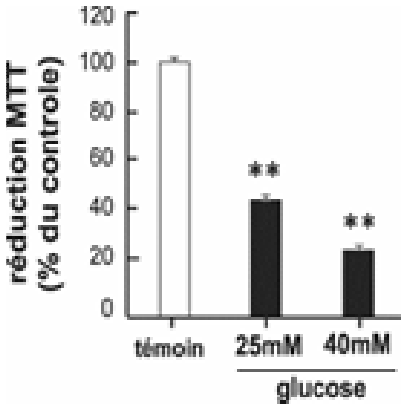

FIG. 1 : Effet de concentrations cytotoxique de glucose sur le métabolisme des cellules rétiniennes. Le métabolisme cellulaire a été mesuré par le test MTT. Les valeurs de conversion de l'MTT sont en pourcentage des cultures contrôles et la moyenne ± SD d'au moins 5 valeurs, ** P<0,01 ; * P <0,05 par rapport au témoin.

Viabilité des cellules rétiniennes dans des conditions expérimentales normales et ischémiques

Le test d'exclusion bleu trypan a révélé qu'au bout de 5 jours d'incubation en présence de 25 mM de glucose, la mort cellulaire est estimée à plus de 50% par rapport aux cultures témoins et qu'en présence de 40 mM, la viabilité cellulaire a chuté à 35,85 ± 4,32% (% de contrôle) (Fig. 2. A). Le nombre de cellules dont le noyau est marqué avec DAPI a diminué de manière significative (P < 0.05) par rapport aux témoins (Fig. 2. A'). Le nombre de cellules vivantes (DAPI+) dans le milieu hyperglycémique 25 et 40 mM traité au antioxydants fucoxanthine et astaxanthine est plus élevé par rapport à celui des cellules cultivées dans le milieu cytotoxique (25 et 40 mM) (Fig. 2. B).

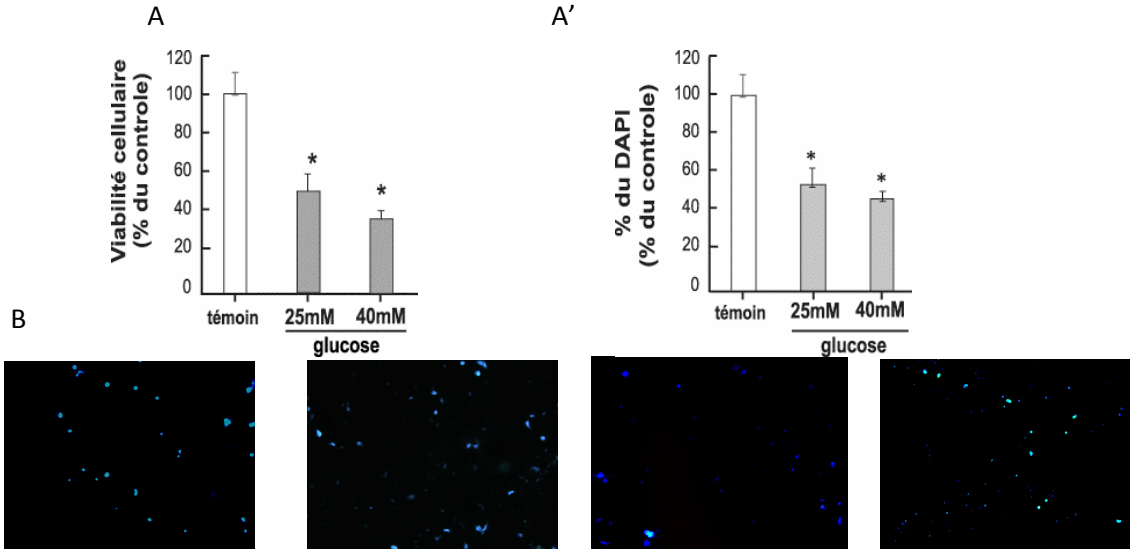

Fig. 2 : Analyse de la viabilité cellulaire des cellules rétiniennes mise en culture à des concentrations ischémiques de glucose. Quantification des cellules viables par A : le bleu de trypan ; A' : marquage par DAPI ; B : maquage par DAPI après traitement par fucoxanthine et astaxanthine .Les valeurs sont en pourcentage par rapport aux contrôles et la moyenne ± SD d'au moins 5 valeurs, ** P <0,01 ; * P <0,05 par rapport au témoin.

DISCUSSION

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, la rétinopathie diabétique est une des principales causes de déficience visuelle parmi les personnes en âge de travailler. *P ob*, un modèle animal de diabète type 2, développe in vivo la RD similaire à celle observée chez l'homme (Saidi *et al.*, 2011). Il a été suggéré que des concentrations élevées de glucose généraient des dommages oxydatif *in vitro* (Wolff *et al.*, 1987). Nos résultats ont révélés l'altération du métabolisme cellulaire rétinien à des concentrations cytotoxiques

de glucose. D'autres études ont démontré la diminution significative de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale des cellules neuronales rétiniennes (Liu *et al.,* 2013) cultivées à des fortes concentrations de glucose. Une baisse significative de la viabilité des cellules a été observée lors de l'exposition à 25 mM et 40 mM de D-glucose pendant 5 jours comme démontrée par des études précédentes montrant que 35 mM de glucose réduit la viabilité de neurones rétiniens de rat Wistar après 72h (Liu *et al.,* 2013) L'Apoptose, a été liée directement à la perte de cellules neuronales et vasculaires en RD (Barber *et al.,* 2011). La mise en culture de la rétine chez le rat à 30 mM de glucose pendant 7 jours induit des caractéristiques de l'apoptose telles que l'augmentation du nombre des cellules positives à TUNEL, marqueur de la fragmentation de l'ADN, médié par la libération de facteurs induisant l'apoptose mitochondriale (AIF) (Santiago *et al.,* 2007). Selon ces résultats, les concentrations élevées de glucose perturbent la viabilité de différentes populations cellulaires rétiniennes en provoquant un dysfonctionnement caractéristique de la voie apoptotique, conduisant à la progression de DR (Feenstra *et al.,* 2013). Les résultats suggèrent également la nécessité d'orienter de futurs études vers la détection du stress oxydatif induit par des concentrations ischémiques de glucose à l'aide d'un nouveau modèle de culture primaire de la rétine tel que *P ob.*

CONCLUSION

La culture primaire de la rétine de *P ob.* pourrait s'avérer un moyen avantageux dans la mise au point de moyens thérapeutiques dans des maladies visuelles pour lesquelles l'hyperglycémie apparaît comme la cause majeure.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3_08 co-financé par l'UE.

BIBLIOGRAPHIE

AKIYAMA T., TACHIBANA I., SHIROHARA H., WATANABE N. and OTSUKI M. (1996). High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract,* 31(1-3): 27-35.

ANTONETTI D. A., BARBER A. J., BRONSON S. K., FREEMAN W. M., GARDNER T. W., JEFFERSON L. S., *et al.* (2006). Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *DIABETES,* 55(9): 2401-2411.

BARBER A. J., ANTONETTI D. A., KERN T. S., REITER C. E., SOANS R. S., KRADY J. K., *et al.* (2005). The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 46(6): 2210-2218.

BARBER A. J., GARDNER T. W. and ABCOUWER S. F. (2011). The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 52(2): 1156-1163.

DU Y., VEENSTRA A., PALCZEWSKI K. and KERN T. S. (2013). Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 110(41): 16586-16591.

FEENSTRA D. J., YEGO E. C. and MOHR S. (2013). Modes of Retinal Cell Death in Diabetic Retinopathy. *J Clin Exp Ophthalmol,* 4(5): 298.

LIU Y., XU X., TANG R., CHEN G., LEI X., GAO L., *et al.* (2013). Viability of primary cultured retinal neurons in a hyperglycemic condition. *Neural Regen Res,* 8(5): 410-419.

MARTIN P. M., ROON P., VAN ELLS T. K., GANAPATHY V. and SMITH S. B. (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 45(9): 3330-3336.

ROBINSON R., BARATHI V. A., CHAURASIA S. S., WONG T. Y. and KERN T. S. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech,* 5(4): 444-456.

SAIDI T., MBAREK S., OMRI S., BEHAR-COHEN F., CHAOUACHA-CHEKIR R. B. and HICKS D. (2011). The sand rat, Psammomys obesus, develops type 2 diabetic retinopathy similar to humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 52(12): 8993-9004.

SANTIAGO A. R., CRISTOVAO A. J., SANTOS P. F., CARVALHO C. M. and AMBROSIO A. F. (2007). High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiol Dis,* 25(3): 464-472.

SHAFRIR E., ZIV E. and KALMAN R. (2006). Nutritionally Induced Diabetes in Desert Rodents as Models of Type 2 Diabetes: Acomys cahirinus (Spiny Mice) and Psammomys obesus (Desert Gerbil). *ILAR Journal,* 47(3): 212-224.

WOLFF S. P.DEAN R. T. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. *Biochem. J.,* 245: 243-250.

ZIV E., PATLAS N., KALMAN R., PELLED D., HERZOG Y., DROR T., *et al.* (2009). A high oleic sunflower oil fatty acid esters of plant sterols mixed with dietary diacylglycerol reduces plasma insulin and body fat accumulation in Psammomys obesus. *Lipids Health Dis,* 8: 42.